

Validation d'un test PCR pour la détection de la paratuberculose bovine par comparaison avec l'examen direct et la coproculture

Ing. A. LEGRAIN
Lic. J-M. SERONT
ISICht – Mons

La paratuberculose bovine est une maladie infectieuse des ruminants causée par Mycobacterium Paratuberculosis. Un dépistage rapide et fiable de la maladie est primordial. La détection par test PCR est comparée qualitativement à une détection par coloration de Ziehl et à une détection par coproculture. Les performances du kit PCR, la limite de détection et la répétabilité du test sont vérifiées. Les conclusions de ce travail s'avérant positives, le test PCR peut être validé.

Mots-clefs : paratuberculose bovine, mycobacterium paratuberculosis, test PCR, coloration de Ziehl-Neelsen, coproculture.

Bovine paratuberculosis is a infect disease of ruminants caused by Mycobaterium Paratuberculosis. A rapid and fiable detection of disease is very important. The detection by PCR test is compared to Ziehl coloration and to faecal culture. Performances, detection limit and repeatability are checked. The conclusions are positives, PCR test can are acknowledgement.

Keywords : bovine paratuberculose, mycobacterium paratuberculosis, PCR test, Ziehl-Neelsen coloration, faecal culture.

1. Introduction

1.1 La paratuberculose bovine et les impacts engendrés

La paratuberculose, ou maladie de Johne a été mise en évidence pour la première fois en Allemagne par Johne et Frottingham en 1895. [1]

C'est une maladie digestive infectieuse des ruminants. Elle est due à la présence et à la multiplication dans la paroi de l'intestin d'une mycobactérie : *Mycobacterium paratuberculosis*. Les symptômes sont l'apparition de diarrhée et un amaigrissement progressif malgré la conservation de l'appétit. Dans les troupeaux laitiers infectés, la maladie se manifeste par la baisse de production laitière. La paratuberculose se rencontre dans toutes les régions à climat tempéré, chez les ruminants domestiques, sauvages ou en captivité. [1] [2]

La paratuberculose est caractérisée par une longue incubation de durée très variable (plusieurs mois, voire des années). [7]

Il existe deux voies possibles de contamination. Une dite verticale, qui envisage la transmission directe du microorganisme d'une mère à son veau, c'est la voie directe. Et l'autre dite horizontale, la voie indirecte, c'est à dire d'un congénère à l'autre via l'intervention d'éléments externes ou non. [2]

La paratuberculose entraîne de lourdes conséquences économiques :

- diminution de la production laitière annuelle;
- coût des soins et des analyses;
- pertes économiques liées à l'élimination de la descendance femelle;
- manque à gagner lié à la réforme prématurée des animaux excréteurs mais aussi à celle des animaux atteints de mammites ou de problèmes de fertilité dont la fréquence est plus élevée dans les cheptels infectés de paratuberculose;
- difficulté voire impossibilité d'accès à certains débouchés commerciaux telle la vente d'animaux reproducteurs sur le marché intérieur comme à l'exportation. [3]

Dès le début des années 80, les travaux de Collin ont alerté sur une implication possible de *Mycobacterium paratuberculosis* dans le développement de la maladie de Crohn chez l'homme. [4]

Cette hypothèse inquiétante, ajoutée à l'impact zootechnique et économique engendré par la maladie, accentue l'intérêt de l'étude de la paratuberculose :

la mise au point d'une méthode fiable pour un dépistage rapide devient donc primordiale.

Deux types de tests sont actuellement développés :

- d'une part, les tests de diagnostics directs, ils consistent à rechercher le germe *Mycobacterium Paratuberculosis* :
 - coloration de Ziehl-Neelsen
 - coproculture
 - PCR
- d'autre part, les tests de diagnostics indirects, ils mettent en évidence la réaction immunitaire déclenchée par le germe chez l'organisme infecté :
 - technique d'intradermotuberculation comparative et test de l'interféron gamma
 - test ELISA

1.2 Etude de *Mycobacterium paratuberculosis*

1.2.1. Taxonomie

Mycobacterium paratuberculosis ou bacille paratuberculeux est une bactérie du genre *Mycobacterium* appartenant à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des Mycobacteriaceae. [2]

1.2.2. Morphologie

Mycobacterium paratuberculosis, ou bacille de Johne se présente comme un bâtonnet droit ou légèrement incurvé de 1 à 2 µm de long et 0.5 µm de large. Il est immobile, non capsulé¹ et non sporulé². Les bacilles sont groupés en amas. [2] [6]

¹ La capsule est composée de polysaccharides. C'est un élément optionnel, facultatif, non vital pour la bactérie. Elle est dépendante de la richesse du milieu de croissance. La capsule joue un rôle de protection contre les protistes, les bactériophages, les agents chimiques et physiques. Elle est la cause de propriétés immunologiques et pathologiques, du pouvoir infectieux du microorganisme, de l'antigénicité et donc de la spécificité sérologique.

² La sporulation traduit la faculté de la bactérie, dans des conditions de milieu non optimales, de s'entourer de couches de membranes particulières. La spore est un état de survie latente de la bactérie. La sporulation se déclenche lorsqu'une carence en éléments nutritifs apparaît dans le milieu, ou lorsque celui-ci devient progressivement défavorable. Au retour de conditions extérieures adéquates, la germination permet à la spore de redevenir une bactérie fonctionnelle, capable de reprendre ses mitoses successives.

1.2.3. Résistance dans le milieu

Mycobacterium paratuberculosis ne peut se multiplier dans le milieu extérieur mais présente une remarquable résistance à l'environnement. Ainsi, *Mycobacterium paratuberculosis* persiste 150 jours dans le fumier, 270 jours dans une eau stagnante, près d'un an dans les bouses. Tous ces milieux sont fréquemment présents à proximité des exploitations d'élevage et rendent donc difficile la prophylaxie.

Dans son environnement naturel, les conditions humides et les milieux acides sont favorables à la survie du bacille. En revanche, la sécheresse, les rayonnements UV, un pH alcalin, l'urine lui sont défavorables.[3]

2. Objectifs et démarche

De par l'impact économique important engendré par la paratuberculose bovine, il est primordial de développer un test possédant à la fois une bonne sensibilité et un faible seuil de détection pour identifier, dès leur plus jeune âge, les bovins atteints par cette maladie. Dans les buts économiques et prophylactiques, il est impératif de prendre des mesures le plus rapidement possible.

Comme test de diagnostic direct, la coloration de Ziehl n'est pas spécifique et la coproculture, habituellement employée, possède un inconvénient majeur : le temps de réponse des résultats est de l'ordre de 6 mois. Une alternative avantageuse est alors le test PCR qui est théoriquement de sensibilité équivalente à la coproculture mais qui permet l'obtention de résultats en une seule journée. La PCR se révèle aussi très avantageuse pour les éleveurs qui pourraient dès lors prendre des dispositions beaucoup plus rapidement.

2.1 Objectifs

L'objectif de ce travail est de comparer le test PCR à des tests déjà utilisés de manière régulière. Un kit PCR est disponible sur le marché, nous allons vérifier ses performances par comparaison aux deux tests de diagnostic direct: la coloration de Ziehl et la coproculture. Nous aurions pu aussi comparer ce test aux méthodes indirectes : la détection de l'interféron gamma et le test ELISA, ceci pourrait faire l'objet d'un travail complémentaire.

Les calculs de la limite de détection et de la répétabilité du test PCR seront également vérifiés. Si les conclusions de ce travail s'avèrent positives, le test PCR pourrait être validé et proposé aux clients du Centre de Prévention et de Guidance Vétérinaire comme alternative à la coproculture.

Le laboratoire vétérinaire a choisi d'utiliser le kit PCR: ADIAVET™ PARATUB commercialisé par la société Addiagène. Le protocole fourni par la firme devra être adapté aux exigences particulières de notre analyse, comme par exemple la présence d'inhibiteur de la réaction de PCR dans les matières fécales. Il devra également être adapté en tenant compte du matériel disponible au laboratoire.

2.2 Démarche

① Dans un premier temps, une lettre fut envoyée aux médecins vétérinaires clients du Centre de Prévention et de Guidance Vétérinaire (+/- 300) afin de récolter le plus grand nombre d'échantillons de matière fécale. Une quinzaine de médecins vétérinaires ont répondu à la demande, et 315 échantillons ont pu être soumis aux différents tests.

② Dès leur réception au Centre, chaque échantillon est encodé et stocké à +4°C.

③ Une coloration de Ziehl-Neelsen et un test PCR sont effectués sur chaque échantillon. Lorsque les résultats diffèrent, la lame correspondante est vérifiée par un(e) technicien(ne) et l'amplification PCR est recommencée.

④ Chaque échantillon positif et 17% des échantillons négatifs³ sont mis en culture. Chaque milieu doit être examiné tous les quinze jours.

⑤ Pour le test PCR, un calcul de la limite de détection est effectué et la reproductibilité est testée.

3. Tests de diagnostic direct

3.1 Coloration de Ziehl-Neelsen

La bactérioscopie consiste à visualiser *Mycobacterium paratuberculosis* dans les matières fécales ou dans certains organes par une méthode de coloration

³ Tous les échantillons positifs sont mis en culture, et en fonction du temps imparti et du nombre de tubes de milieu restant, une partie des négatifs aussi de manière à vérifier et confirmer la spécificité du milieu de culture de Herrold.

spécifique des mycobactéries, la coloration de Ziehl-Neelsen. Le germe mis en évidence par cette technique est le bacille acido-alcoolo-résistant (BAAR).[8]

Le résultat obtenu est qualitatif, il correspond à l'observation de la présence ou non d'amas de bacilles acido-alcoolo-résistants. Il peut aussi être semi-quantitatif mais va dépendre de l'état de prélèvement. Selon le nombre d'amas observés, une appréciation (+, ++ ou +++) est attribuée à la lame.

Ce test est très simple à réaliser, rapide et d'un coût modéré (0,22€⁴) [5]

Des résultats faussement négatifs peuvent résulter d'un manque de sensibilité lors de diarrhée profuse ou d'un niveau d'excrétion inférieur à 10^5 à 10^6 germes/g de fèces, ce qui est le cas d'un animal excréteur asymptomatique.[5] [8]

Des résultats faussement positifs peuvent apparaître par manque de spécificité, car il est impossible de distinguer morphologiquement *Mycobacterium paratuberculosis* des autres mycobactéries présentes éventuellement dans les fèces des bovins.[5]

3.2 Coproculture

Mycobacterium paratuberculosis est une espèce à croissance lente. Ce qui implique qu'elle ne peut se développer sur milieux bactériologiques standards.

Un des milieux le plus couramment utilisé est le milieu de Herrold. C'est un milieu à base d'œuf. Il doit contenir toutes les substances nécessaires à la croissance et à la vie de cette bactérie. Il contiendra donc les éléments essentiels (du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore), un facteur de croissance⁵ (de la Mycobactin J) et un facteur stimulant (du pyruvate de sodium).

L'apparition de colonies caractéristiques des mycobactéries dans les tubes de milieu enrichi de mycobactine mais non dans le tube qui en est dépourvu permet l'identification et l'isolement de *Mycobacterium paratuberculosis*.

L'addition d'antibiotiques au milieu de culture inhibe ou retarde la croissance d'autres microorganismes et garantit la sélectivité du milieu.

⁴ Le prix indiqué ne tient pas compte de l'amortissement du matériel et de la rémunération du personnel.

⁵ Substance organique indispensable à la croissance de la bactérie mais que celle-ci est incapable de synthétiser.

Les premières colonies apparaissent dès la quatrième semaine, des résultats valables sont obtenus seulement après 16 semaines et un échantillon peut n'être déclaré négatif qu'après 6 mois.

Le résultat de la culture fécale peut être exprimé de manière qualitative (positif ou négatif) et semi-quantitative : on précise alors le délai d'apparition des colonies et l'intensité de la culture.[5]

La coproculture est la technique de référence. Elle est fiable, sensible et d'un coût modéré (3,31€⁶).[5]

Le délai de réponse est particulièrement long, jusqu'à six mois. Des erreurs par défauts peuvent être observées si le niveau d'excrétion est inférieur au seuil de sensibilité de la méthode (10^2 germes/g).[5]

3.3 Test PCR

Le test PCR comporte trois étapes: - Extraction de l'ADN
- Amplification de l'ADN (PCR)
- Détection de l'ADN

3.3.1. Extraction

L'extraction de l'ADN est réalisée au moyen de réactifs lysants.

3.3.2. Amplification

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise au point par Karry Mullis en 1985.

Cette technique amplifie des fragments spécifiques de l'ADN. Le matériel de départ d'une PCR est de l'ADN du bacille qui contient la séquence à amplifier. La réaction ne nécessite que de faibles quantités d'ADN. La séquence d'insertion de *Mycobacterium paratuberculosis* est la séquence hautement spécifique IS900 qui est présente 14 à 19 fois dans son génome.

Les acteurs de la PCR:

① L'ADN

L'ADN polymérase utilise de l'ADN monocaténaire comme matrice pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire Cette matrice d'ADN monocaténaire peut être obtenue en dénaturant de l'ADN bicaténaire à une

⁶ Le prix indiqué ne tient pas compte de l'amortissement du matériel et de la rémunération du personnel.

température proche du point de fusion (94 à 97°C) de la molécule.



② Les amorces

Deux amorces, sens et anti-sens : ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les deux oligonucléotides amorces sont choisis de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier de sorte que chaque brin nouvellement synthétisé s'étende au-delà de la position de l'amorce sur le brin opposé.



③ Une enzyme

La Taq Polymerase (Taq Pol) est une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C mais elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C ce qui permet l'automatisation de la procédure.

TAQ

④ Les 4 nucléotides

dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), sont les éléments de base utilisés par la Taq Polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.



La réaction

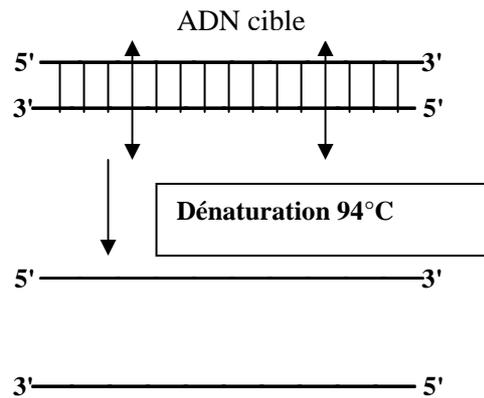
Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- dénaturation;
- hybridation;
- élongation.

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

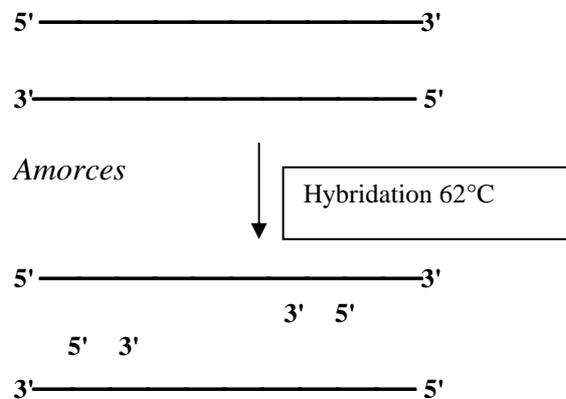
① Dénaturation

Le tube est chauffé quelques secondes à 94°C. Les double-brins d'ADN se séparent. L'ADN est donc dénaturé.



② Hybridation

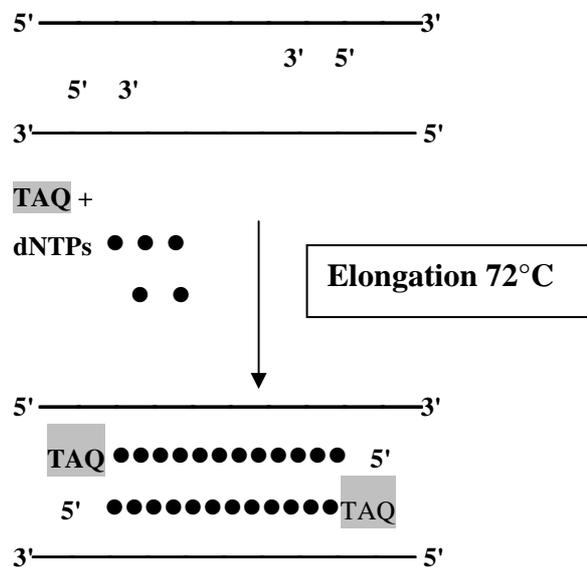
La température est rapidement abaissée à 62°C. Les amorces "reconnaissent" leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute pour laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement. La température et la durée de l'hybridation sont fonction de la taille des oligonucléotides. L'ADN total ne peut pas se réhybrider car les conditions de température et de temps ne lui sont pas favorables.



③ Elongation

La température du tube est ensuite élevée à 72°C, ce qui permet à la Taq Polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides se fixent de façon complémentaire à la séquence cible (nucléotide complémentaire).

Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.



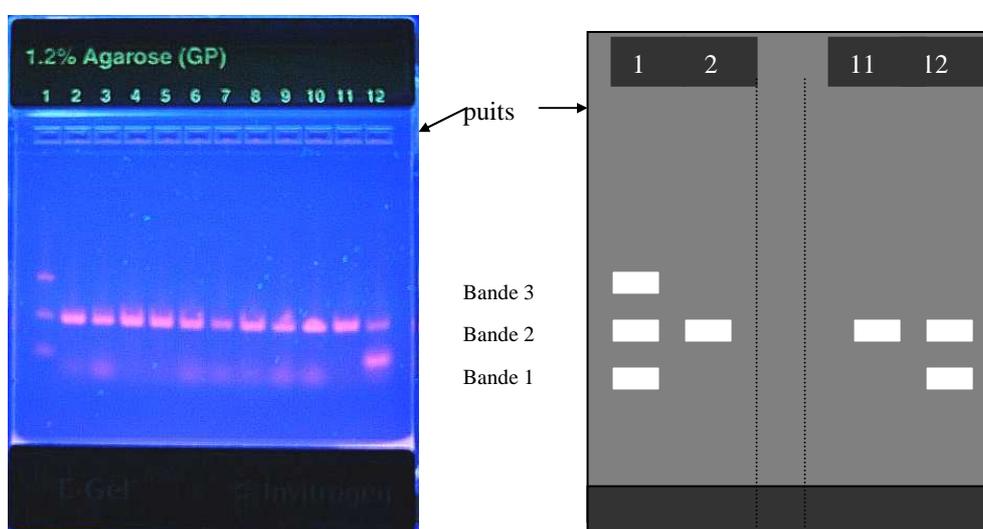
Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé.

3.3.3. *Electrophorèse et détection par le bromure d'éthidium*

La quantité d'ADN après amplification est suffisante pour être visualisée à l'aide du Bromure d'Ethidium (BÉt). Il s'agit d'un colorant qui a la faculté de s'insérer dans la double hélice en se glissant entre les bases des acides nucléiques. Lorsqu'elle est intercalée, cette molécule présente une fluorescence sous illumination par des UV courts (environ 300 nm). Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné de BEt. La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées.

Résultats de la PCR après la migration de l'ADN amplifié sur le gel d'agarose :



Le test est considéré comme valide si une seule bande identique à la bande n°2 du marqueur de taille est observée dans le tube contrôle négatif (puits 11).

L'échantillon est considéré comme négatif si une seule bande correspondant à la bande n°2 du marqueur de taille est observée (puits 2).

L'échantillon est considéré comme positif si une bande correspondant à la bande n°1 du marqueur de taille est observée. La bande n°2 peut être amplifiée (puits 12).

bande n°2	-	+	+	-
bande n°1	+	+	-	-
Echantillon	Positif	Positif	Négatif	Non déterminé

Les performances actuelles de la technique PCR sont considérées comme équivalentes à la coproculture en terme de sensibilité. La PCR possède l'avantage permet d'obtenir une réponse beaucoup plus rapidement (durée de réalisation de 48 heures).

Le test PCR possède trois principaux inconvénients: la présence parfois fréquente d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les matières fécales, la détection des bactéries mortes (puisque'une bactérie morte contient encore de l'ADN) et le coût élevé du test (+/- 20 €⁷).

Remarque: les références bibliographiques du chapitre concernant la PCR sont les suivantes: [5] [9] [10] [11]

4. Résultats

	Frottis Ziehl	Test PCR	Coproculture
Echantillons positifs	5	10	10
Echantillons négatifs	310	305	49
Nombre total d'échantillon	315	315	59

Figure 1: Tableau comparatif des résultats obtenus pour chacun des tests

4.1 Critique des résultats

Le tableau de la figure 2 nous renseigne sur le nombre de résultats positifs ou négatifs obtenus. Tous les échantillons ont été traités en coloration de Ziehl et par PCR. Les échantillons positifs à un ou deux tests sont mis en culture. Selon le temps disponible et suivant le nombre de tubes restant après l'ensemencement des échantillons positifs, des échantillons négatifs aux deux tests ont été mis en culture de manière à vérifier et confirmer la spécificité du milieu de Herrold. Ainsi, 17 % des échantillons négatifs ont été testés par la coproculture.

La répartition des bacilles dans les fèces est hétérogène et par conséquent, leur détection présente un caractère aléatoire.

⁷ Le prix indiqué ne tient pas compte de l'amortissement du matériel et de la rémunération du personnel.

La technique PCR et la coproculture détectent deux fois plus d'échantillons positifs que la coloration de Ziehl. Plusieurs explications peuvent être données à cette différence. La sensibilité de la coloration de Ziehl est de 10^5 à 10^6 germes par gramme de fèces, celle de la coproculture est de 10^2 germes par gramme et de la PCR de 10^3 germes par gramme.

Les échantillons peuvent être classés en quatre catégories :

→ Les échantillons positifs aux trois tests

Selon les trois tests, les bovins, dont sont issus les échantillons, sont atteints par la paratuberculose bovine. Les résultats obtenus doivent être vérifiés par un diagnostic vétérinaire. La paratuberculose possède des symptômes très caractéristiques comme une diarrhée profuse, un amaigrissement sans diminution d'appétit, une anémie, une chute de la production, etc. Une autopsie peut aussi être réalisée afin de confirmer les résultats.

→ Les échantillons positifs à la PCR et à la coproculture

Les seuils de détection du test PCR (10^3 germes/g de fèces⁸) et de la coproculture (10^2 germes/g de fèces¹²) sont presque équivalents et sont beaucoup plus faibles que le seuil de détection du frottis Ziehl (de 10^5 à 10^6 germes/g de fèces⁸). Ces résultats sont donc plausibles. Le taux de bacilles contenus dans l'échantillon de matière fécale est suffisant pour le test PCR et la coproculture mais insuffisant pour que le frottis Ziehl soit positif. Il se peut que pour certains échantillons, lors de l'étalement des matières fécales décontaminées sur la lame d'analyse, les bacilles n'aient pas été prélevés alors que l'échantillon en contenait.

→ Les échantillons positifs au frottis Ziehl et à la PCR

L'interprétation de pareils résultats est moins évidente car si le test est positif au frottis Ziehl et à la PCR, il devrait théoriquement l'être à la coproculture pour les raisons de sensibilité déjà explicitées.

Plusieurs explications peuvent être à l'origine de cette divergence.

La plus évidente est la mauvaise homogénéisation des matières fécales. Les bacilles, surtout au début de la maladie, sont excrétés de manière intermittente. Il se peut que lors des prélèvements respectifs, l'échantillon de matière fécale ait été mal homogénéisé et que dès lors, des bacilles aient été prélevés pour le test PCR mais pas pour la coproculture.

⁸ Valeurs théoriques issues de la littérature.

Une deuxième raison concerne la viabilité des bactéries. La PCR peut amplifier de l'ADN issu de bactéries mortes tandis que des bactéries mortes ne peuvent croître lors de leur mise en culture.

Des cycles de congélations et décongélations successifs peuvent altérer les échantillons et être létaux à des bacilles de Johne moins résistants.

→L'échantillon positif à la PCR

L'interprétation de ce résultat rejoint les commentaires précédents. Des bacilles ont pu être prélevés pour la PCR et non pour la coproculture et la coloration de Ziehl de par l'hétérogénéité des fèces. Peut-être le taux de bacilles était-il trop faible pour être décelable lors de la coloration de Ziehl. Le fait que l'échantillon soit négatif à la coproculture pourrait être expliqué par la viabilité des bactéries et les cycles de congélations et décongélations successifs.

4.2 Analyse statistique

Un test d'indépendance a été réalisé à partir des résultats obtenus. L'indépendance entre les trois tests a été vérifiée par le test du Khi-carré. Les tests ont d'abord été comparés tous les trois et ensuite deux par deux. Les conclusions sont identiques, les résultats positifs et négatifs sont comparables dans les trois méthodes.

4.3 Vérification de la répétabilité

La répétabilité est vérifiée pour un quelconque échantillon testé positif et un quelconque échantillon testé négatif. Tester la répétabilité signifie répéter le même test dans des conditions identiques avec le même manipulateur et le même matériel. A partir d'un échantillon, dix extractions sont effectuées. Chaque produit extrait est ensuite amplifié et détecté. Toutes les extractions ainsi que toutes les amplifications et détections sont effectuées en même temps, avec du matériel et des réactifs identiques et dans des conditions semblables.

Dans les deux cas, la répétabilité est vérifiée.

4.4 Calcul de la limite de détection

4.4.1. Au départ d'une souche de *Mycobacterium paratuberculosis*

Une quantité connue de germes est prélevée grâce à la méthode de l'inoclic⁹. Ce prélèvement est dilué dans 10 ml d'eau déminéralisée. A partir de cette solution, des dilutions de 10 en 10 sont réalisées. Une extraction est réalisée à partir de chaque dilution. Chaque produit d'extraction est ensuite amplifié et détecté.

La plus petite concentration de germes détectée sera égale à la quantité de germes contenue dans la grande dilution révélée positive. La plus petite dilution révélée positive est la dilution 1x, c'est à dire l'échantillon non dilué.

Le volume total est de 10 ml, en considérant les dilutions successives: la suspension bactérienne avant l'extraction de l'ADN doit donc contenir au moins $3 \cdot 10^6$ CFU/10 ml soit $3 \cdot 10^5$ CFU/ml. La solution qui sera amplifiée contient l'ADN extrait de l'équivalent de 150 CFU.

4.4.2. Au départ de germes mis en présence de matières fécales

A partir de colonies de *Mycobacterium paratuberculosis* issues du même tube de culture, deux séries de dilution sont effectuées. Les colonies sont prélevées grâce à l'inoclic de manière à obtenir une concentration connue et reproductible d'une série à l'autre et sont mises en présence de 1 g de matières fécales exemptes de bacilles paratuberculeux. Une série de neuf dilutions de 5 en 5 est réalisée à partir de l'échantillon contaminé. A partir de chaque dilution, une extraction, une amplification et une détection sont effectuées. Les conditions opératoires sont identiques pour les deux séries.

Les résultats diffèrent d'un gel à l'autre. Les conditions opératoires étant identiques, les différences ne peuvent s'expliquer par un facteur externe.

La discordance des résultats peut provenir de la répartition hétérogène des bacilles dans les fèces. La souche de *Mycobacterium paratuberculosis* a été introduite manuellement dans des matières fécales théoriquement¹⁰ exemptes de germes paratuberculeux. L'homogénéisation des matières fécales des deux séries n'est pas strictement reproductible. Les matières fécales sont solides, cela ne facilite pas l'incorporation des germes.

⁹ L'inoclic est une tige spiralée qui, lorsqu'elle est piquée dans une colonie, présente l'intérêt de prélever de manière reproductible de 1 à 3 10^6 CFU.

¹⁰ Les matières fécales utilisées sont négatives à la coloration de Ziehl et au test PCR.

La plus petite concentration de germes détectée sera égale à la quantité de germes contenue dans la plus grande dilution révélée positive. Pour le premier gel, la plus petite dilution révélée positive est la deuxième et pour le deuxième gel c'est la quatrième. Pour le calcul, nous prendrons la moyenne. La suspension bactérienne avant l'extraction de l'ADN doit donc contenir au moins $1,2 \cdot 10^5$ germes/5 ml soit $2,4 \cdot 10^4$ CFU/ml. La solution qui sera amplifiée contient l'ADN extrait de l'équivalent de 12 CFU.

4.4.3. Conclusions

Nous avons une différence d'un facteur 10 entre les deux méthodes. Ce qui correspond plus ou moins à une différence de dilution 10 entre les deux. Nous n'avons pas assez d'éléments pour comparer les deux méthodes et faire un calcul précis de la limite de détection. Pour avoir une idée plus précise de la limite de détection, il faudrait refaire ces deux tests une dizaine de fois. Sur base de ces résultats uniques, la deuxième méthode paraît plus sensible que la première. Or, nous nous attendions au contraire car les matières fécales contiennent des inhibiteurs de la réaction PCR.

5. Conclusions - Discussions

L'impact économique et l'implication possible de *Mycobacterium paratuberculosis* dans la maladie de Crohn accentuent l'intérêt de l'étude de la paratuberculose bovine, de la validation et de la critique du test PCR.

La comparaison de la technique PCR à la coloration de Ziehl et à la coproculture a permis de mettre en évidence et de confirmer les données théoriques recueillies dans la littérature. Le test PCR offre une alternative très intéressante à la coproculture. La PCR possède des qualités de détection et de spécificité qui sont très proches de celles proposées par la coproculture. Elle permet d'obtenir une réponse très rapidement, en ± 6 heures. Son principal défaut est le prix de l'analyse qui est 100 fois supérieur à celui d'une coloration de Ziehl-Neelsen et 6 fois celui de la coproculture.

La répétabilité a bien été vérifiée pour un échantillon positif et pour un échantillon négatif. Les limites de détection n'ont été qu'approchées et pour les confirmer, il faudrait effectuer plusieurs fois les tests. Un seul essai n'est

pas suffisant pour apporter des valeurs précises et fiables. L'analyse statistique nous apprend qu'il y a une convergence entre les trois méthodes pour les résultats positifs et négatifs. Celles-ci sont donc comparables. La précision de l'analyse statistique serait améliorée si le nombre d'échantillons positifs était plus grand.

La comparaison du test PCR aux deux autres techniques de dépistage de la paratuberculose bovine ajoutée à la vérification de la répétabilité et à l'approche du calcul de la limite de détection autorise la validation du test PCR. Le test PCR pourrait dès lors être proposé aux vétérinaires clients du Centre de Prévention et de Guidance Vétérinaire. La rapidité du résultat permet à l'éleveur de prendre rapidement les décisions qui s'imposent.

Perspectives...

Les deux principaux inconvénients du test PCR sont le coût et la présence d'inhibiteurs de la réaction de polymérisation contenus dans les matières fécales. La diminution du coût et l'atténuation des effets des inhibiteurs sont donc deux paramètres qu'il serait intéressant d'approfondir.

L'incidence de *Mycobacterium paratuberculosis* sur la maladie de Crohn est mal connue mais pas exclue. En outre, *Mycobacterium paratuberculosis* a été isolé dans le colostrum et le lait. 35% des bovins atteints de paratuberculose clinique et 3 à 10% des animaux excréteurs asymptomatiques éliminent des bacilles dans leurs sécrétions mammaires. Il serait intéressant d'effectuer des tests PCR sur des échantillons de lait avant et après la pasteurisation de celui-ci. Ces tests permettraient de connaître l'importance de la concentration bacillaire dans le lait en fonction du stade de la maladie et de vérifier si la pasteurisation est létale pour le bacille.

6. Références bibliographiques

- [1] GODFROID Jacques, BOELAERT Frank, WALRAVENS Karl et LIMBOURG Bernard, *Paratuberculose: nouvelles approches pour une problématique actuelle*, Le monde vétérinaire, n°44, Février 1998, pp 7-11.

- [2] DOUART Alain et MAILLARD Renaud, *Etiologie et épidémiologie de la paratuberculose bovine*, Le point vétérinaire, n°219, Octobre 2001, pp 38-42.
- [3] VIALARD Jacquemine, *Epidémiologie de la paratuberculose*, *Bulletin des groupements techniques vétérinaires*, Hors série paratuberculose des ruminants, 2002, pp 6-11.
- [4] SCHELCHER François, *Paratuberculose: de la connaissance de la maladie au contrôle collectif*, *Bulletin des groupements techniques vétérinaires*, Hors série paratuberculose des ruminants, 2002, pp 5.
- [5] VIALARD Jacquemine, *Diagnostic et dépistage*, *Bulletin des groupements techniques vétérinaires*, Hors série paratuberculose des ruminants, 2002, pp 23-27.
- [6] VINCENT V., *Les mycobactéries: bacilles de la tuberculose*, chapitre 345, dans J. FRENEY, F. RENAUD, W. HANSEN et C. BOLLET, *Manuel de bactériologie clinique*, Volume II, 2^e édition, Paris, Edition scientifique Elsevier, 1994, 1128 p (collection option Bio).
- [7] SCHOENAERS F. et KAECKENBEECK A., *Maladies infectieuses des animaux domestiques*, tome III, Liège, Edition Derouaux, 1972, 241p (Faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège).
- [8] BRUGERE-PICOUX Jeanne, MAILLARD Renaud et DOUART Alain, *Paratuberculose: quels tests de diagnostics utiliser?*, le point vétérinaire, n°220, Novembre 2001, pp 50-53.
- [9] SERONT Jean-Michel, *Cours de Biochimie*, 4^{ème} Ingénieur Industriel, Chimie-Biochimie, ISIC.
- [10] *La technique PCR* (page consultée en juin 2002). Adresse URL: <http://www.ilm.pf/pcr.htm>
- [11] HALLDORSOTTIR Stefania, ENGLUND Stina, FREDSVOLD NILSE Sigrun et OLSAKER Ingrid, *Detection of Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridisation*, *Veterinary microbiology*, n°87, 2002, pp327-340 (Elsevier).